Catatan Penelitian

Pengambilan Enzim Peroksidase dari Daun Tomat dengan Menggunakan Teknik Pertukaran Ion

Separation of Peroxidase Enzyme from Tomato Leaves using Ion Exchange Technique

Tri Utami, Ahmad N. Al-Baarri*, Anang M. Legowo

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang

*Korespondensi dengan penulis (albari@undip.ac.id)

Artikel ini dikirim pada tanggal 9 November 2016 dan dinyatakan diterima tanggal 20 Mei 2017. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui www.jatp.ift.or.id. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists © 2017

Abstrak

Enzim peroksidase telah banyak digunakan untuk berbagai bidang baik industri, kesehatan, dan pangan. Peroksidase dapat diambil dari berbagai sumber, salah satunya adalah daun tomat. Hingga saat ini, daun tomat tidak banyak dimanfaatkan dan hanya menjadi limbah pertanian. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan proses purifikasi enzim peroksidase dari daun tomat dengan menggunakan teknik pertukaran ion. Larutan daun tomat dalam ammonium sulphate buffer dilewatkan ke dalam kolom yang berisi resin. Fraksi hasil elusi dikumpulkan dengan cara melewati NaCl dalam *phosphate buffer* (PB) ke dalam kolom. Fraksi ini kemudian diukur absorbannya pada spektrometer dengan panjang gelombang 280 nm. Jumlah fraksi yang berhasil didapat dari proses elusi ini adalah 90 fraksi. Berdasarkan pengamatan absorbansi, maka didapat bahwa fraksi dengan urutan ke-52 merupakan fraksi yang mempunyai nilai absorbansi yang terbesar, yaitu sebesar 0,220 dan mempunyai kandungan protein sebesar 0,144%. Penelitian ini telah berhasil untuk melakukan pengambilan enzim peroksidase. Penelitian ini sangat berguna untuk bahan informasi lanjutan untuk menganalisis enzim peroksidase dari daun tomat dan memurifikasinya sehingga dapat membuka peluang penggunaan peroksidase dari sumber nabati yang relatif lebih murah harganya.

Kata kunci: daun tomat, enzim peroksidase, purifikasi, aktivitas, pertukaran ion

Abstract

Peroxidase enzyme has been widely used in several fields such as industries, medical, and food. One of the resources of peroxidase is tomato leaf, which was the waste in the agricultural field. This research was done to obtain peroxidase using ion exchange method. Tomato leaf solution in ammonium sulphate buffer was eluted through column containing resin. The NaCl was used to remove the attached enzyme to resin. Total obtained fraction from elution with NaCl was 90 fractions and all fractions were directly detected its absorbance at 280 nm. The result showed that fraction number 52 showed highest peak with the value of 0.220. Based on protein determination, fraction number 52 showed the protein content of 0.144%. This result may provide the information to further process of enzyme purification and take the advantage of waste product of tomato leaf to obtain peroxidase with a very cheap in price.

Keywords: *tomato leaves, peroxidase enzymes, enzyme activity, ion exchange*

Pendahuluan

Penelitian mengenai pemanfaatan enzim peroksidase telah banyak dilakukan terutama yang berkaitan dengan bidang industri, kesehatan, dan pangan. Aplikasi di bidang industri telah berhasil memanfaatkan enzim peroksidase untuk mereduksi air limbah dari senyawa fenolik, mensintesis senyawa aromatik dan mengurangi peroksida dari limbah industri (Bodalo *et al.*, 2006). Sementara itu, aplikasi enzim tersebut di bidang kesehatan telah berhasil digunakan untuk analisis kuantitatif asam urat, glukosa dan kolesterol (Rahardjo, 2004). Pemanfaatan enzim ini dalam bidang pangan dinilai telah berhasil untuk menghasilkan sebuah senyawa antimikroba yang dapat dimanfaatkan sebagai pengawet makanan. Selain itu peroksidase juga mampu meningkatkan aktivitas antioksidan pada teh (Cahyana *et al.*, 2006).

Sumber enzim peroksidase dapat ditemukan banyak di alam, seperti pada sumber pangan nabati yang dapat diperoleh dari batang brokoli (Cahyana *et al.*, 2006), bonggol jagung (Ilmi dan Kuswyasari, 2003), daun mangkogan (Handayani, 2008), lobak putih (Pudjiraharti dan Karossi, 2009), *water spinach* (Rusdi *et al.*, 2014), sedangkan pada sumber hewani terdapat

di susu dalam bentuk sistem laktoperoksidase (Al-Baarri *et al.*, 2011).

Sementara itu tomat yang merupakan komoditas sayur lain yang mudah ditemukan di Indonesia hingga kini pemanfaatannya masih didominasi oleh buahnya saja, antara lain sebagai minuman, pelengkap sayur, perawatan kecantikan, dan produk-produk inovasi lainnya. Sementara itu batang dan daun tomat meski jumlahnya melimpah, hingga kini hanya sebagian dimanfaatkan sebagai kompos dan sisanya dibuang. Daun tomat tidak mungkin dikonsumsi sebagai sayuran karena kandungan glikoalkaloid. Glikoalkaloid merupakan senyawa beracun yang apabila dikonsumsi dalam jumlah banyak akan menyebabkan sulit bernafas, mual dan muntah (Dinnarwika, 2012). Selain senyawa yang sifatnya racun, daun tomat ternyata juga berpotensi sebagai sumber enzim peroksidase dan untuk menghasilkannya masih harus melalui beberapa tahap perlakuan yang cukup panjang (Pratiwi, 2009).

Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi enzim peroksidase dari daun tomat yang dipurifikasi dengan menggunakan prinsip pertukaran ion sehingga dapat dihasilkan senyawa peroksidase yang nantinya dapat diaplikasikan di dunia pangan.

Materi dan Metode

Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tomat, H₂O₂ (Merck, Germany), SP-FF Sepharose (Sigma-Aldrich, USA, Lot No. MKBS5227V), Sodium Chloride (HIMEDIA, India), di-Sodium Hydrogen Phosphate (HIMEDIA, India) dan bahan reagen lainnya yang sesuai dengan dipersyaratkan. Alat yang digunakan diantaranya timbangan analitik, kolom purifikasi, *centrifuge tube*, *centrifuge*, *vortex*, micropipet, *refrigerator*, *Slow Rate Blower*, *microtube*, satu unit alat elektroforesis, spektrofotometer.

Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2015 - Januari 2016 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan dan UPT Laboratorium Terpadu Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

Pembuatan *Phosphat Buffer* yang mengandung NaCl

Pembuatan buffer ini dilakukan dengan membuat konsentrasi NaCl dalam 0,1M *phosphate buffer* (PB) pH 6,5 dalam tiga bagian: 0,5; 1,0; dan 1,5 M. Pembuatan PB ini mengacu pada penelitian Rodriguez-lopez *et al.* (2000). Ketiga macam konsentrasi ini digunakan untuk mengambil peroksidase dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

Pembuatan Larutan Daun Tomat

Daun tomat dipersiapkan untuk dijadikan larutan sesuai dengan petunjuk Kokkinakis dan Brooks (1979) yang dimulai dengan menyiapkan daun tomat sebanyak 400 g yang kemudian ditambahkan 0,1 M Amonium Sulfat (HIMEDIA, India) sebanyak 400 ml. Pencampuran dilakukan dengan bantuan hand mixer pada putaran yang paling rendah. Hasil yang didapatkan disaring menggunakan kain saring dan disentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya bagian supernatan diambil untuk dimasukkan ke dalam kolom yang mengandung resin. Volume bagian supernatan yang telah berhasil diambil dari perlakuan proses ini adalah 300 ml.

Proses Purifikasi Peroksidase dari Daun Tomat

Proses purifikasi dimulai dengan melakukan pengaliran supernatan melewati kolom (dengan diameter 5 cm dan panjang 40 cm) yang telah diisi dengan resin SP-Sepharose FF sebanyak 60 g. Pertama-tama, 0,1 M PB pH 7,0 dialirkan ke dalam kolom tersebut sebanyak 300 ml secara perlahan. Proses ini diulang hingga tiga kali dan dalam suhu 4°C. Selanjutnya, sebanyak 300 ml bagian supernatan, dialirkan ke dalam kolom secara perlahan. Output yang keluar dari kolom, dibuang dan untuk mengambil enzim yang terikat pada resin, dilakukan fraksinasi dengan cara mengalirkan 300 ml larutan 0,1 M PB pH 6,5 yang mengandung NaCl dalam berbagai tingkat konsentrasi: 0,5; 1,0; dan 1,5 M. Tiap konsentrasi berjumlah 300 ml dan fraksi yang terkumpul, ditampung dalam *centrifuge tube* 10 ml. Berdasarkan tahap kegiatan fraksinasi ini, maka dapat dikumpulkan sebanyak 90 buah tabung. Metode ini diadopsi dari penelitian sebelumnya (Rodriguez-lopez *et al.* 2000). Setelah semua fraksi

(90 fraksi) terkumpul, maka segera disimpan dalam suhu 4°C dan dalam keadaan tertutup.

Perhitungan Kadar Protein Masing-masing Fraksi

Perkiraan total protein tiap fraksi dihitung dengan cara melihat absorbansi masing-masing fraksi pada panjang gelombang 280 nm (Touch *et al.*, 2005). Kadar protein sampel (%) ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \frac{A_{280}}{1,5} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Keterangan:

A₂₈₀ : Absorbansi protein pada panjang gelombang 280nm

1,5 : Faktor konversi protein

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan metode analisis deskriptif kuantitatif dan kualitatif. Analisis deskriptif kuantitatif dan kualitatif digunakan untuk memberikan gambaran umum tentang data yang telah diperoleh. Gambaran umum ini dapat menjadi acuan untuk melihat karakteristik dari data. Data yang diperoleh kemudian diklarifikasi untuk dapat mendeskripsikan dan menghubungkannya dengan sejumlah variabel lain sesuai parameter yang diteliti. Hasil yang diperoleh diakumulasikan secara bersama-sama untuk menarik simpulan dan saran yang tepat untuk melaksanakan penelitian sejenis dengan baik.

Hasil dan Pembahasan

Proses Elusi Larutan Daun Tomat

Menurut Bollag *et al.* (1991) prinsip dari teknik ekstraksi enzim terdiri dari dua tahap yaitu pencucian dengan pengestrak dan sentrifugasi, oleh karena itu, penelitian ini mengadopsi prinsip tersebut, yaitu dengan cara pencucian dengan aquades dan sentrifugasi. Daun tomat dipilih dengan seksama dan hanya daun tomat yang siap panen, yaitu daun yang berwarna hijau tua, yang dipilih dalam penelitian ini. Hal ini sesuai dengan pendapat Bashan *et al.* (1985) bahwa aktivitas peroksidase yang ada pada daun tanaman tomat dewasa lebih tinggi dibandingkan aktivitas PO pada daun tanaman tomat muda. Larutan daun tomat, dibuat dengan cara melarutkan daun tomat dalam amonium sulfat dengan perbandingan 1:1 supaya tidak terlalu pekat. Penelitian dengan menggunakan perbandingan yang lebih pekat, ternyata dihasilkan larutan daun tomat yang pekat sehingga akan mengganggu proses selanjutnya (Data tidak ditampilkan).

Sebanyak 400 g daun tomat dilarutkan dalam 400 ml amonium sulfat. Setelah diendapkan dan disaring, maka didapat larutan sebanyak 300 ml. Hasil penyaringan larutan daun tomat ini menyisakan 100 ml presipitat. Filtrat kemudian diputar dengan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit untuk mengambil bagian supernatan. Penggunaan ammonium sulfat dinilai sangat baik digunakan untuk pelarut enzim agar tidak merusak sifat fungsional enzim itu sendiri (Kokkinakis dan Brooks, 1979). Selanjutnya bagian supernatan yang dihasilkan digunakan untuk tahap berikutnya.

Tabel 1. Karakteristik Proses Ekstraksi untuk Saat Proses Pengambilan Peroksidase dari Daun Tomat.

Parameter	Kondisi saat aplikasi
Jumlah daun tomat (gram)	400
Jumlah ammonium sulfat (ml)	300
Lama sentrifugasi (menit)	20
Kecepatan sentrifugasi (rpm)	6000
Jumlah resin yang digunakan (gram)	60
Suhu saat pelaksanaan (°C)	4

Tabel 2. Parameter Visual Hasil Elusi dari Proses Pengambilan Peroksidase dengan Menggunakan *Ion Exchange Chromatography*

Parameter	Hasil yang diperoleh
Kecepatan alir purifikasi (ml/menit)	0,65
Jumlah fraksi berwarna hijau pekat (tube)	35
Jumlah fraksi berwarna hijau (tube)	20
Jumlah fraksi berwarna jernih (tube)	29
Kejernihan larutan supernatan pra dilusi ke dalam kolom	Tidak jernih
Bau yang ditimbulkan pada elusi	Berbau daun tomat

Proses selanjutnya adalah mengambil enzim dan membuang zat-zat terlarut lain selain enzim. Supernatan yang didapatkan kemudian dielusikan ke

Penelitian ini menggunakan *SP-Sepharose* yang merupakan jenis *cation exchanger resin*. Jenis ini bersifat negatif sehingga akan mengikat protein yang bermuatan positif. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Rodríguez-López (2000) maka dapat disimpulkan bahwa peroksidase dari tanaman tomat, terbagi dalam dua pl, yaitu pl sekitar 9 dan 3,7. Diantara dua pl tersebut, pl dengan nilai 3,7 dideteksi memiliki konsentrasi yang lebih tinggi daripada pl 9. Penelitian tersebut menggunakan daun tomat yang belum siap panen. Oleh karena itu, daun tomat yang diambil dalam penelitian ini adalah dari daun tomat yang siap panen agar jumlah peroksidase lebih banyak.

Fungsi dari larutan NaCl adalah untuk memisahkan enzim yang terikat secara ionik pada resin sehingga enzim dapat keluar pada hasil elusi dari resin (Touch *et al.*, 2005). Hasil elusi kemudian ditampung dengan menggunakan tube yang kemudian disebut dengan "fraksi". Larutan untuk menghasilkan elusi adalah NaCl dalam PB dengan konsentrasi 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M.

Kondisi saat aplikasi proses pengaliran larutan daun tomat dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan tabel tersebut, maka dapat diketahui bahwa pelaksanaan kegiatan purifikasi dilakukan pada kondisi dingin (4°C) agar dapat mempertahankan kualitas enzim. Jumlah larutan yang siap dialirkan ke dalam kolom adalah 300 ml dan tampak berwarna hijau dan berbau daun tomat.

Hasil dari pengamatan visual terhadap hasil elusi dapat dilihat pada Tabel 2. Kecepatan alir proses pada purifikasi ini, terdeteksi 0,65 ml/menit atau 39 ml /jam dan semakin lama alirannya semakin lambat. Lama waktu proses purifikasi adalah 31 jam. Berdasarkan pada buku manual prosedur yang didapat dari pabrik pembuat resin, resin ini mempunyai diameter antara 40 sampai 165 µm dengan rata-rata diameter sebesar 90 µm. Kecepatan alir sesuai dengan *GE manual procedure*, dapat mencapai aliran sebanyak 20 ml/jam, namun dalam penelitian ini, didapat kecepatan alir yang sangat lebih rendah dari yang tertulis pada prosedur pemakaian resin.

dalam kolom yang berisi resin. Selanjutnya dilakukan pengaliran NaCl dalam PB ke dalam kolom berisi resin untuk melepaskan enzim yang terikat pada resin. Kadar Protein

Pengukuran kadar protein pada setiap fraksi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm. Hasil pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer pada setiap fraksi yang dapat dilihat pada Figur 1. Panjang gelombang 280 nm digunakan untuk mengetahui jumlah protein pada hasil sampel purifikasi protein, protein yang terlarut akan menyerap sinar UV dengan baik. Hal ini sesuai dengan pendapat Purwanto (2014) yang menyatakan bahwa asam amino protein optimum pada spektrofotometer panjang gelombang 280 nm.

Berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm, maka didapat nilai absorbansi tertinggi sebesar 0,228 yang didapat dari fraksi nomor 52. Berdasarkan hasil dari jumlah protein maka fraksi ini mengandung protein sebesar 0,152%. Nilai absorbansi ini perlu diklarifikasikan lagi dengan jumlah aktivitas enzim dan profil proteinnya. Nilai ini jauh lebih besar jika dibandingkan dengan penelitian Rodríguez-López *et al.* (2000) yang menyimpulkan hasil dari kadar protein adalah sebesar 0,03-0,05%. Fraksi ini juga dihitung jumlah proteinnya dengan menggunakan metode perhitungan protein Bradford yang menghasilkan kadar protein sebesar 0,44% yang juga menandakan bahwa hasil yang didapat pada penelitian ini masih jauh lebih besar dari penelitian Rodríguez-López *et al.* (2000).

Kesimpulan

Isolasi senyawa peroksidase dengan prinsip teknik pertukaran ion dari daun tomat mampu menghasilkan enzim dengan kadar protein hingga 0,144 %. Dengan demikian daun tomat berpotensi sebagai sumber penghasil enzim peroksidase yang cukup menjanjikan di masa yang akan datang.

Daftar Pustaka

- Al-Baarri, A.N., Hayashi, M., Ogawa, M., Hayakawa, S. 2011. Effect Of Mono- And Disaccharides On The Antimicrobial Activity Of Bovine Lactoperoxidase System. *J. Food Prot. Journal of Food Protection*, 74(1),134-13.

- Al-Baarri, A.N., M. Hayashi, M. Ogawa, S. Hayakawa. 2010. Scale-Up Studies On Immobilization Of Lactoperoxidase Using Milk Whey For Producing Antimicrobial Agent. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.*, 35(3),185-191.
- Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y. 1985. Peroxidase, Poluphenoloxidase, and Phenols in Relation to Resistance Against *Pseudomonas Syringae* pv. *Tomato* in Tomato Plants. *Journal of Botani*, 65, 366-372.
- Bodalo, A., Gomez, J.L., Gomez, E., Bastida, J., Maximo, M. F.. 2006. Comparison of Commercial Peroxidase for Removing Phenol from Water Solutions. *Chemosphere*, 63(4), 626-632.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.S. 1991. *Protein Method. Second Edition*. Wiley Liss, New York.
- Cahyana, A.H., Handayani, R., Ardiyanti. H.D. 2006. Pemanfaatan Enzim Peroksidase Dari Brokoli (*Brassica oleacea* L.) untuk Meningkatkan Kapasitas Antioksidan Teh Hijau (*Camelia Sinensis*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 4(1), 1-12.
- Dinnarwika, S.N. 2012. Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Solanum Lycopersicon* Linn.) Sebagai Insektisida Terhadap Nyamuk *Culex* Sp. Dengan Metode Elektrik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Handayani, S.N., Zufahair, Rofika, D.R. 2008. Penggunaan Enzim Peroksidase dari Daun Mangkakan untuk Penurunan Kadar Fenol. *Seminar Nasional Aplikasi Sains dan Teknologi*, 189-194.
- Kokkinakis, D.M., Brooks, J.L. 1979. Tomato Peroxidase. *Plant Physiol*, 63(1979), 93-99.
- Pratiwi, S.A. 2009. Pengaruh Pemberian Jus Buah Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill) terhadap Perubahan Warna Gigi pada Proses Pemutihan Gigi secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro. Semarang
- Purwanto, M.G.M. 2014. Perbandingan analisa kadar protein terlarut dengan berbagai metode spektroskopi UV - Visible. *Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*, 7 (2), 64 - 71.
- Rahardjo, R. 2004. *Kumpulan Kuliah Farmakologi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Rusdi, B., Mulyanti, D., Rodiyah, M. 2014. Characterization of Peroxide Enzyme from Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.). *Procedia Chemistry*, 13(2014), 170-176.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Espin, J.C., Tudela, J., Martinez, V., Cerda, A., Garcia-Canovas, F. 2000. Purification and Kinetic Characterization of Peroxidase from Tomato Cultivated under Different Salinity Conditions. *Journal of Food Science*, 65 (1), 15-19.